



GOBIERNO NACIONAL DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR

Econ. Rafael Correa Delgado
PRESIDENTE CONSTITUCIONAL

Econ. Wilfrido Staynley Vera Prieto
MINISTRO DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
ACUACULTURA Y PESCA

Dr. Julio Cesar Delgado Arce
DIRECTOR GENERAL DEL INIAP

MISIÓN DEL INIAP

Generar y proporcionar tecnologías apropiadas, productos, servicios y capacitación especializados para contribuir al desarrollo sostenible de los sectores agropecuario, agroforestal y agroindustrial.

MISIÓN DEL DEPARTAMENTO NACIONAL DE PROTECCIÓN VEGETAL-EESC

Generar tecnología de manejo integrado de problemas fitosanitarios para los principales cultivos de la Sierra; prestación de servicios técnicos y de laboratorio, en apoyo a una producción agrícola sostenible y sustentable.

Información:

Departamento Nacional de Protección Vegetal, EESC, INIAP
Km 1 Panamericana Sur, Quito. Telefax: (593) 02 2690-693



Estación Experimental Santa Catalina
Departamento Nacional de Protección Vegetal

GUÍA DE PROSPECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS EN ECUADOR

Editores
C. Castillo
P. Gallegos
C. Asaquibay
M. Oña



Manual Técnico No. 88
Quito – Ecuador

**Editores:***Carmen Castillo C. ¹**Patricio Gallegos G. ¹**César Asaquibay I. ¹**Marcia Oña V. ²*

¹ Investigadores del DNPV, EESC, INIAP

² Asistente de laboratorio del DNPV, EESC, INIAP

1ª Edición: Manual Técnico No. 88 (2010)

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)

Estación Experimental Santa Catalina (EESC)

Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV)

Telefax: 593-2-2690-693

Casilla: 17-01-340

E-mail: patricio.gallegos@iniap.gob.ec

carmen.castillo@iniap.gob.ec

cesar.asaquibay@iniap.gob.ec

Edición, diseño y diagramación:

IDEAZ. (593-2) 2543-709/ 2900-191

Fotografías: C. Asaquibay, M. Oña, C. Castillo

Revisión de Texto:

Comité de Publicaciones de la Estación Experimental Santa Catalina

Cita correcta: Castillo C., Gallegos P., Asaquibay C. y Oña M. (editores). 2011. Guía de prospección y producción de nematodos entomopatógenos. INIAP, EESC, Departamento Nacional de Protección Vegetal. Quito. Manual Técnico No. 88. 15 p.

Nota: Guía basada en publicaciones realizadas por Henry Kaya (Universidad de California, Davis), Jesús Alcázar, Jessica Salazar y Verónica Cañedo (Centro Internacional de la Papa, Lima), experiencias del INISAI de la República Bolivariana de Venezuela, e investigaciones efectuadas por el DNPV de la EESC, INIAP, Ecuador.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEPs)
 - Géneros entomopatógenos
 - *Heterorhabditis*
 - *Steinernema*
3. AISLAMIENTO DE NEPs DESDE EL SUELO
 - Utilización de trampas White
 - Utilización de insectos trampa
4. RECUPERACIÓN DE NEPs DE LARVAS DE *Galleria mellonella*
5. ALMACENAMIENTO DE NEPs
 - En cajas Petri o recipientes plásticos
 - En esponjas dentro de fundas plásticas
6. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE JUVENILES INFECTIVOS EN UNA SUSPENSIÓN
7. RENOVACIÓN DE NEPs
8. MULTIPLICACIÓN DE NEPs
9. MULTIPLICACIÓN DE NEPs EN EL CAMPO CON AGRICULTORES
10. CRÍA DE *Galleria mellonella*
11. CRÍA DE *Spodoptera frugiperda*
12. REFERENCIAS

PRESENTACIÓN

*La biodiversidad del Ecuador es amplia en especies vegetales y animales, y también se manifiesta en la presencia de microorganismos como los nematodos entomopatógenos. El INIAP realizó muestreos en las provincias de Carchi, Chimborazo, Cotopaxi y Tungurahua, y recolectó 28 aislamientos de nematodos entomopatógenos correspondientes a los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*. Estos aislamientos han sido caracterizados y utilizados en pruebas de control de plagas en los cultivos de papa y frutales andinos.*

El control biológico de insectos mediante el uso de nematodos entomopatógenos requiere un mayor desarrollo en nuestro país.

La presente guía tiene el propósito de poner en manos de técnicos y estudiantes, involucrados con el control biológico, una herramienta que permita la obtención y el uso de nematodos entomopatógenos en nuestra agricultura.

Los editores dejan constancia de su reconocimiento al Dr. Jurgen Kroschel, Ing. Jesús Alcázar, Biol. Verónica Cañedo del CIP – Lima, al Dr. Javier Franco de PROINPA - Bolivia, integrantes del proyecto FONTAGRO “Desarrollo y uso de enfoques ecológicos en el manejo de plagas para el mejoramiento sustentable de la producción de papa de los agricultores de bajos recursos en las regiones de altitud intermedia de los Andes de Bolivia, Ecuador y Perú”, bajo cuyos auspicios se realizaron investigaciones sobre nematodos entomopatógenos, y la presente publicación. Expresan especial reconocimiento al Dr. Harry Kaya por la información impartida en su publicación “Prácticas de Laboratorio con Nematodos Entomopatógenos”. Finalmente reconocen la contribución del proyecto “Soberanía y seguridad alimentaria basadas en la producción de alimentos” ejecutado por el INIAP, por la gira de observación sobre controladores biológicos a Venezuela.

*Patricio Gallegos
Responsable del DNPV-EESC*

1. INTRODUCCIÓN

Entre los enemigos naturales de insectos plaga, los nematodos entomopatógenos son agentes importantes que regulan sus poblaciones y, por lo tanto, pueden constituirse en elementos de control.

En la naturaleza, los nematodos entomopatógenos se encuentran en poblaciones bajas, sin embargo, su recolección y aislamiento ha sido posible luego de identificar una forma de captura relativamente fácil. El conocimiento de métodos de aislamiento, multiplicación y almacenamiento permitirá desarrollar mayor investigación y apoyar al control biológico de plagas en el Ecuador.

2. NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) son parásitos obligados de insectos que pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*).

Los NEPs forman mutualismo con bacterias de los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, específicos para cada género de NEPs. De esta asociación mutualística, los NEPs se benefician porque las bacterias interfieren con el sistema de inmunidad del huésped, matan al insecto hospedero por septicemia, descomponen sus tejidos (Figura 1), y generan antibióticos que inhiben el crecimiento de hongos y otras bacterias. Esto permite a los NEPs multiplicarse dentro del cadáver y dispersarse en la naturaleza. Por otro lado, las bacterias utilizan a los nematodos para su protección y transporte, y para evadir el sistema inmunológico que el huésped genera contra bacterias.



Figura 1. Larvas de escarabeidos (cutzos) en diferentes estados de infección causada por nematodos parásitos de insectos.

Los NEPs tienen un amplio rango de hospederos dentro de la clase insecta, son efectivos especialmente para insectos del suelo. Investigaciones realizadas sobre pruebas de seguridad con los NEPs y con sus bacterias mutualísticas, han demostrado inocuidad en ratas y pollos. En el caso de otros artrópodos, los

NEPs pueden afectar a ciempiés, milpiés y arañas, cuando se encuentran en altas concentraciones.

El ciclo de vida de los NEPs inicia en el estado de huevo, luego pasa por cuatro estados juveniles (J1 a J4) y finalmente llega al estado de adulto. Dentro del insecto huésped se desarrollan dos o tres generaciones de nematodos. Los NEPs que pertenecen al tercer estado juvenil (J3) se los denomina juveniles infectivos (JIs) y son estos los únicos que tienen la capacidad de ingresar a los insectos.

Géneros entomopatógenos

Heterorhabditis

Dentro de la familia Heterorhabditidae se encuentra el género *Heterorhabditis* que cuenta con 8 especies. Los NEPs pertenecientes a este género se desplazan a través del suelo buscando al huésped, siendo más efectivos para encontrar insectos sedentarios que se alimentan de raíces en zonas más profundas. Pueden ser hermafroditas y también presentar individuos machos y hembras diferenciados. Penetran al hospedero por aberturas naturales (ano, boca y espiráculos) y por la cutícula. Las larvas de insectos infectadas con estos NEPs presentan una coloración café rojiza (Figura 2).



Figura 2. Larvas de *Galleria mellonella* infectadas por NEPs del género *Heterorhabditis*.

Steinernema

Dentro de la familia Steinernematidae se encuentra el género *Steinernema* con alrededor de 30 especies. Los NEPs de este género solamente se localizan en la superficie del suelo, por lo que infectan a huéspedes activos y móviles sobre el suelo. Presentan individuos con sexos separados. Penetran por aberturas naturales como espiráculos,

boca y ano. Las larvas infectadas con estos nematodos muestran una coloración blanca o crema (Figura 3).



Figura 3. Larvas de *Galleria mellonella* infectadas por NEPs del género *Steinernema*.

3. AISLAMIENTO DE NEPs DESDE EL SUELO

Para determinar la presencia de NEPs en un terreno específico se deben tomar varias muestras del suelo y mezclarlas para obtener una muestra representativa y homogénea del área. Para el aislamiento se pueden utilizar trampas White o insectos trampa. Los nematodos recolectados deben pasar por los postulados de Koch para comprobar si son entomopatógenos.

Utilización de trampas White

La trampa White está formada por un plato Petri grande (15cm de diámetro) en el que se ponen 35cc de agua destilada y otro plato Petri más pequeño (9cm de diámetro). Dentro del último, se coloca un papel filtro húmedo y sobre este 10g del suelo de la muestra (Figura 4), es importante mantener la humedad del suelo. Los NEPs, retenidos en el agua, pueden ser observados a los 20 días.



Figura 4. Extracción de NEPs de suelo con el uso de trampas White.

Utilización de insectos trampa

Otra alternativa consiste en colocar 400g del suelo muestreado en envases plásticos de medio litro y poner 10 larvas de *Galleria mellonella* (polilla de los panales de abejas) (Figura 5, izquierda). La humedad del suelo debe estar cercana a la capacidad de campo. Posteriormente se coloca la tapa y se invierte el envase (Figura 5, derecha). Los envases deben mantenerse a una temperatura de 16°C por 15 días.



Figura 5. Utilización de insectos trampa (*Galleria mellonella*) para la extracción de NEPs del suelo.

Las larvas de *G. mellonella*, luego de permanecer en contacto con el suelo muestreado, deben ser rigurosamente observadas y seleccionadas. Si las larvas muertas tienen olores fuertes y desagradables, es posible que estén contaminadas con bacterias no deseadas. Si las larvas tienen un aspecto duro, es probable que se encuentren infectadas con hongos u otro tipo de organismos de descomposición. Así, únicamente se deben seleccionar larvas con los síntomas característicos de infección de NEPs, anteriormente descritos (Figuras 2 y 3). Limpiar las larvas de los excrementos y colocarlas en cajas Petri con papel toalla. Las cajas tienen que permanecer a temperatura ambiente por dos días y ser mantenidas en oscuridad.

4. RECUPERACIÓN DE NEPs DE LARVAS DE *Galleria mellonella*

Las larvas con los síntomas de infestación de NEPs deben ser trasladadas con mucho cuidado a trampas White (Figura 6), evitando que se rompan ya que los nematodos en estados no infectivos podrían salir. Mantener las trampas cubiertas con un plástico negro para evitar la luz.



Figura 6. Trampa White con larvas de *Galleria mellonella* infectadas con NEPs.

Los NEPs empiezan a salir del cadáver cuando llegan al tercer estado juvenil (juveniles infectivos) luego de aproximadamente seis días en el caso de *Steinernema* y de 10 días en *Heterorhabditis*. Los nematodos se movilizan por el papel húmedo hasta llegar al agua del plato Petri donde quedan atrapados. Se recolecta el agua con los nematodos y se renueva el agua en la trampa ya que después de cuatro días se debe realizar una segunda cosecha y luego de otros cuatro días la tercera y última cosecha. Se pueden llegar a obtener de 15000 a 30000 JIs de NEPs por larva de *G. mellonella*. Posteriormente salen más nematodos pero deben ser descartados por ser adultos no infectivos.

Una vez “cosechados” los NEPs deben ser traspasados a recipientes con agua destilada. Estos recipientes se colocan en forma inclinada por unos 20 minutos para que repose el agua y los nematodos lleguen al fondo del recipiente por decantación. Se repite este proceso de lavado cambiando el agua tres veces. Descartar el agua sobrenadante y coleccionar los NEPs para su almacenamiento.

5. ALMACENAMIENTO DE NEPs

En cajas Petri o recipientes plásticos

Para el almacenamiento se pueden emplear cajas Petri de 15cm de diámetro o recipientes de igual tamaño que puedan contener una delgada lámina de agua, extendida lo más posible, y que puedan ser tapados ligeramente. Agregar dos gotas de bicarbonato al 1% en el agua para evitar que los NEPs se peguen entre sí por sus excrementos. En cada caja Petri o recipiente pueden introducirse 30ml de agua destilada con una concentración de 7200 a 16500 NEPs, esto depende de la especie ya que algunas soportan permanecer en altas densidades y otras no. No se deben sellar los platos o recipientes para facilitar el paso de aire fresco al interior.

Las cajas o recipientes con NEPs deben ser refrigerados a una temperatura de 10°C y pueden ser apilados para ahorrar espacio dentro del refrigerador (Figura 7). Cada 20 o 30 días revisar el nivel del agua de cada caja y en el caso de que se haya evaporado, el volumen debe ser reemplazado.

De esta manera los NEPs pueden ser almacenados por tres meses. Luego de este periodo los NEPs deben ser renovados (ver Renovación de NEPs).



Figura 7. Almacenamiento de NEPs en cajas Petri en un refrigerador a 10°C.

En esponjas dentro de fundas plásticas

Otro método de almacenamiento de NEPs consiste en colocar la suspensión de agua con los nematodos en esponjas cortadas en tiras de aproximadamente 1x1x5cm. En una funda plástica de 15x15cm se pueden poner 15 tiras de esponja y 120ml de agua con una concentración de 68000 NEPs. La concentración puede incrementarse según la capacidad de sobrevivencia de la especie a altas densidades. Las fundas deben ser selladas con calor y pueden ser apiladas dentro del refrigerador (Figura 8). La temperatura de almacenamiento deberá permanecer a 4°C. Con esta metodología se pueden almacenar NEPs por un periodo de 4 a 6 meses con la ventaja de que no hay pérdida de agua por evaporación, y la renovación de los NEPs se realizaría al final del almacenamiento.



Figura 8. Almacenamiento de NEPs en esponjas dentro de fundas plásticas.

6. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE JUVENILES INFECTIVOS EN UNA SUSPENSIÓN

Cuando los NEPs han sido extraídos mediante trampas White, se realiza el proceso de lavado y decantación anteriormente citado. Se extrae la mayor cantidad del agua del último lavado y se afora a un volumen de 300ml de suspensión con agua destilada. Mantener en movimiento la suspensión, tomar 10 μ l y colocar en una caja Petri con cuadrantes para facilitar el conteo de los nematodos (Figura 9, A). Con la ayuda de un estereoscopio contar todos los NEPs contenidos en los 10 μ l (Figura 9, B). Contabilizar los nematodos de las cinco repeticiones y promediar, el promedio multiplicar por la cantidad de agua (300ml) y dividir para 0.01mm (10 μ l). El resultado obtenido corresponderá a la cantidad de NEPs en la suspensión.

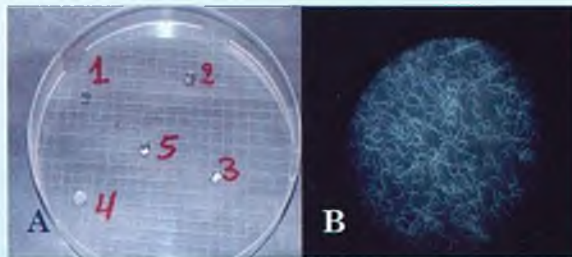


Figura 9. A, repeticiones de la suspensión para el conteo de NEPs. B, gota de 10 μ l con NEPs observada bajo el estereoscopio a 30x.

7. RENOVACIÓN DE NEPs

Es conveniente renovar los NEPs que estén almacenados por tres o seis meses, según su tipo de almacenamiento. Luego de sacar las suspensiones de NEPs del refrigerador dejar en reposo por 10-15 minutos. Tomar 1ml de suspensión que contenga de 200 a 250 JIs y colocar sobre un papel filtro en una caja Petri (9cm diámetro). Poner 10 larvas de *G. mellonella* (Figura 10) y tapar. Las cajas no deben sellarse para que exista entrada de aire, pero deben ser colocadas dentro de una funda negra de plástico para reducir la evaporación del agua y el paso de luz. Incubarlas a 20-24°C por cinco días, luego abrir las cajas para mejorar la aireación y tapar nuevamente, las fundas negras ya no son necesarias. Dejar por cinco días más las cajas dentro de la incubadora. Posteriormente, se pasan las larvas de *G. mellonella* a trampas White para extraer los NEPs renovados.



Figura 10. Renovación de NEPs en larvas de *Galleria mellonella*.

8. MULTIPLICACIÓN DE NEPs

Para multiplicar los NEPs en el laboratorio se siguen los mismos pasos que en la renovación, difiriendo únicamente en el incremento del número las larvas de *G. mellonella* a ser inoculadas (mantener 10 larvas por caja Petri). La multiplicación se puede realizar en larvas de *G. mellonella*, *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Scarabeidae*.

9. MULTIPLICACIÓN DE NEPs EN EL CAMPO CON AGRICULTORES

Para la multiplicación de NEPs a nivel de pequeñas fincas, el agricultor puede utilizar una compostera tradicional de 2.5m de largo y 1.25m de ancho, con un borde de tablas de 20cm de alto. Para rellenar la compostera se mezcla una parte de materia orgánica (excrementos de animales menores y ganado vacuno) con tres partes de tierra (relación 1:3). Colocar 100 larvas de escarabeidos (cutzos) y 15 larvas de *G. mellonella* infestadas con NEPs en el interior de la compostera. También se puede inocular la compostera con un litro de una solución de NEPs en agua a una concentración de 225000 JIs de NEPs. Es importante tapar la compostera con paja para proteger de los rayos solares y del frío, y mantener la humedad (Figura 11, A). Extremos de humedad o sequía son perjudiciales para la multiplicación de los NEPs en composteras, por lo que se recomienda verificar la humedad de la compostera cada semana y mantenerla a capacidad de campo.

Después de 45 a 60 días (a un promedio de temperatura de 13°C en el exterior de la compostera), se pueden recolectar las larvas de escarabeidos infectadas por los NEPs (Figura 11, B) y utilizarlas en el aporque del cultivo de la papa para reducir poblaciones de gusano blanco y polillas, en plantas frutales contra escarabeidos (cutzos) y para otros insectos plaga del suelo.

El promedio de NEPs por larva de escarabeido o cutzo (de 1.8 a 2.8g de peso) fluctúa entre 13000 y 32000 individuos.

Otra forma de aplicar los NEPs multiplicados en composteras es utilizar el compost producido. Para esto se debe esperar 30 días más para que los NEPs abandonen las larvas de escarabeidos y se dirijan al compost (Figura 11, C). De esta manera se pueden poner 0.5kg de compost por planta de papa antes del aporque, especialmente en los surcos y plantas de los bordes del lote, y en otros cultivos que tengan insectos plagas del suelo.

Para seguir multiplicando los NEPs en más composteras, tomar 15kg del suelo de la compostera que ya tenga NEPs libres en el compost (o 15 larvas de escarabeidos infestadas con NEPs) y mezclar con el contenido de la nueva compostera junto con 100 larvas "nuevas" de escarabeidos (cutzos).



Figura 11. A, compostera para la multiplicación de NEPs en larvas de escarabeidos (cutzos). B, larvas de escarabeidos infestadas en la compostera. C, colonización de los NEPs en el suelo de la compostera.

10. CRÍA DE *Galleria mellonella*

Galleria mellonella es una polilla que se desarrolla en panales de abejas alimentándose de la cera. Tiene metamorfosis completa, pasa por cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 12). La larva de *G. mellonella* pasa, a su vez, por cuatro instares. El último instar es el óptimo para ser hospedero de NEPs y ser utilizado en la multiplicación de estos controladores biológicos.



Figura 12. Huevos, larvas, pupas (sin y con capullo) y adulto de *Galleria mellonella*.

A esta polilla se la debe capturar preferiblemente en la Costa porque las larvas son de mayor tamaño. Se cuelgan panales desechados cerca de apiarios, a manera de trampa. A estos panales llegan las polillas de *G. mellonella* y ovipositan. Las larvas eclosionadas entran y se desarrollan comiendo el panal. Colocar estos panales en envases plásticos resistentes de 20x30x20cm con tapas que tengan respiraderos cubiertos por una malla metálica (Figura 13, A). Almacenar los recipientes en áreas destinadas para la cría, a 28°C y 70% de humedad relativa. Una vez que se obtengan adultos se inicia la cría. Los insectos adultos deben ser colocados en recipientes cubiertos con tela tul (Figura 13, B).



Figura 13. A, envases plásticos con tapa de malla metálica para el desarrollo de larvas. B, recipientes cubiertos con tela tul para adultos.

En los recipientes (ej. balde plástico de 4 litros de capacidad) colocar un algodón empapado de miel de abeja disuelta en agua, como fuente de alimento (Figura 14, A). Colocar también un pedazo de papel encerado, doblado varias veces en forma de acordeón y engrapado en varios sitios, para que sirva como lugar de oviposición (Figura 14, B). Poner hasta 300 polillas adultas en cada recipiente y cubrir con tela tul (Figura 13, B).

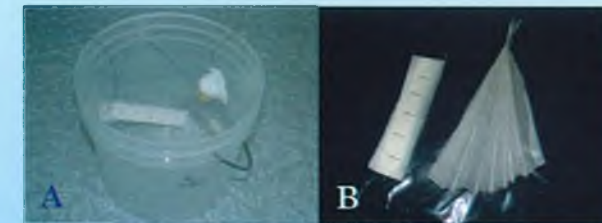


Figura 14. A, recipiente para polillas adultas. B, forma de plegar el papel encerado para las oviposiciones.

Al cabo de una semana, el papel encerado ya contiene aproximadamente 4000 oviposturas. Colocar de 2 a 3 papeles con oviposturas sobre panales de abeja (aproximadamente 250g) contenidos en una caja plástica, con

tapa que tenga respiraderos cubiertos de malla metálica. Esta tapa debe ser cubierta con papel absorbente para mantener la temperatura. Previo a su uso, los panales deben ser congelados (-15°C) por 3 días para evitar que ácaros o cualquier otro organismo no deseado invada la cría. Añadir al panal 6g de polen y 7g de “pellets” de comida de perro triturada como suplemento alimenticio para las larvas recién eclosionadas (Figura 15). Es importante rociar agua y mantener cierta humedad para el desarrollo adecuado de las larvas.

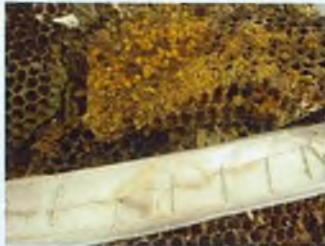


Figura 15. Oviposturas de *Galleria mellonella* en papel encerado sobre panales de abeja y polen.

Cuando las larvas ya están en segundo o tercer instar, es necesario dividir la cantidad de larvas por caja para un mejor desarrollo. Estos instares ya no necesitan suplemento alimenticio, solamente se deben poner más láminas de panal según el consumo de las larvas y rociar agua dos veces por semana para mantener la humedad.

Cuando las larvas alcanzan el último instar de desarrollo tienen el tamaño óptimo para ser inoculadas con NEPs y pueden ser cosechadas. Las larvas que continúan en la cría, pasarán a los estados de pupa y adulto, completando el ciclo de desarrollo de esta polilla.

11. CRÍA DE *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (cogollero) es una mariposa plaga que en estado de larva se alimenta de follaje de maíz y hortalizas, entre otros cultivos importantes.

La multiplicación de NEPs también puede realizarse en larvas de *S. frugiperda*. Para iniciar la cría de este insecto se debe realizar una recolección de larvas o adultos en el campo. Las larvas pueden ser colocadas en recipientes y ser alimentadas con hojas de higuera

(*Ricinus communis*) que crece de forma espontánea en la Sierra y Costa del Ecuador. Las hojas de higuera proveen el alimento necesario para que las larvas de *S. frugiperda* se desarrollen normalmente y evitan (por efecto de su composición química) que se coman entre ellas ya que en instares superiores son caníbales (Figura 16).



Figura 16. Larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con hojas de higuera (*Ricinus communis*).

Colocar los adultos en recipientes independientes cubiertos con tela tul o nylon para facilitar el intercambio de aire. Utilizar láminas de papel filtro para que las hembras ovipositen y algodones impregnados de panela o miel de abeja (disueltas en agua) como suplemento alimenticio. Trasladar las oviposturas maduras a recipientes con hojas de higuera para que las larvas, luego de la eclosión de los huevecillos, comiencen a alimentarse.

Una vez que la cría se establezca, se recolectan las larvas del último estadio para infestarlas con juveniles infectivos de NEPs. Los procedimientos del manejo de los NEPs son los indicados anteriormente.

12. REFERENCIAS

Argotti, E. 2007. Prospección de nematodos entomopatógenos para el control de *Tecia solanivora* (Povolny), polilla de la papa en Ecuador. Tesis de maestría en Ciencias del Control Biológico. Quito, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 105 p.

Hernández, P. 2006. Colección, patogenicidad y caracterización ecológica de nematodos parásitos de insectos en gusano blanco (*Premnotrypes vorax* Hustache) en Ecuador. Tesis de maestría en Ciencias del Control Biológico. Quito, EC. Escuela Politécnica del Ejército de Ciencias Agropecuarias. 96 p.

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. 2006. Colección, identificación, patogenicidad y caracterización ecológica de nematodos parásitos de insectos en gusano blanco (*Premnotrypes vorax*) y polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) de la papa en Ecuador. In: Informe anual 2006. Departamento Nacional de Protección Vegetal, EESC. Autores: P. Hernández, E. Argotti, J. Alcázar, S. Garcés, P. Gallegos, J. Revelo, C. Asaquibay, V. Cañedo.

Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral, INISAI. 2010. Curso taller sobre "Producción de biofertilizantes, entomopatógenos y antagonistas en la red de laboratorios de producción de bioinsumos", de abril 18 a mayo 2. República Bolivariana de Venezuela.

Kaya H, Alcázar J y Salazar J. 2005. Practicas de laboratorio con nematodos entomopatógenos. In: Curso de control biológico de plagas mediante microorganismos, del 20 al 25 de junio. Centro Internacional de la Papa. Lima.